

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA –  
PIBIC**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *VARRONIA  
CURASSAVICA* JAQC. SOBRE O PATÓGENO DE PLANTAS *XANTHOMONAS  
CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS* E SEU EFEITO SOBRE A INTEGRIDADE DA  
MEMBRANA CITOPLASMÁTICA**

Área do conhecimento: Bioquímica (2.08.00.00-2)  
Subárea do conhecimento: Bioquímica de Micro-organismos (2.08.02.00-5)  
Especialidade do conhecimento: xxxx

Relatório Parcial  
Período da bolsa: de (Agosto 2018) a (Julho 2019)

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica

PIBIC/CNPq

Orientador: Roberta Pereira Miranda Fernandes

Autora: Mayara Mendes Gonçalves de Oliveira

## Sumário

|                                   |    |
|-----------------------------------|----|
| <u>INTRODUÇÃO</u>                 | 3  |
| <u>OBJETIVOS</u>                  | 4  |
| <u>METODOLOGIA</u>                | 5  |
| <u>RESULTADOS</u>                 | 9  |
| <u>DISCUSSÃO</u>                  | 19 |
| <u>CONCLUSÃO</u>                  | 19 |
| <u>PERSPECTIVAS</u>               | 20 |
| <u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u> | 20 |
| <u>OUTRAS ATIVIDADES</u>          | 23 |

## RESUMO

Devido à ausência de estudos acerca do efeito antimicrobiano do óleo essencial (OE) de *Varronia curassavica* no controle da podridão negra, (doença causada por *Xanthomonas campestris*), o presente trabalho avaliou a atividade antimicrobiana de sete genótipos de *Varronia curassavica* Jacq. e de seus compostos majoritários sobre o patógeno de plantas *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 629IBSBF e efeito dos OEs sobre a integridade da membrana citoplasmática. Em relação à atividade antimicrobiana, os setes genótipos apresentaram forte inibição do crescimento sobre *Xcc*. A concentração mínima inibitória (CMI) dos OEs varia entre 500 µg/mL a 1000 µg/mL, sendo os genótipos VCUR-202 e -302 com maior atividade antimicrobiana. A curva do estudo tempo-morte demonstrou que o OE-VCUR-202 (2x, 1x, 1/2x MIC) e VCUR-302 e (2x, 1x MIC) inibiram 100% do crescimento celular de *Xcc*-629IBSBF, após 24 horas de exposição. Estes dados foram confirmados pela formação das UFC/mL, modo de ação através do extravasamento do iodeto de propídio (IP), material celular nuclear, marcação por sonda (SYTO/PI) por microscopia eletrônica de fluorescência e citometria de fluxo. Assim, este estudo indica que os OEs com maior atividade antimicrobiana VCUR-202, -302 causam danos à membrana celular citoplasmática, reduzindo a viabilidade antimicrobiana, sendo uma opção de produto natural no controle biológico contra *Xcc*.

**Palavras-chave:** Fitopatógeno, podridão negra, brássicas, óleo essencial, mecanismo de ação.

## INTRODUÇÃO

*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (*Xcc*) são bactérias fitopatogênicas, gram-negativas que possuem mobilidade através de flagelo polar único e suas colônias compreendem coloração amarela. (MONTEIRO, 2002; ROTTAVA, 2005; JACQUES *ET AL.*, 2016). A coloração amarela se dá através da produção de um pigmento denominado de xantomonadina (HE, et al 2011). Bactérias dessa espécie produzem uma série de enzimas extracelulares, incluindo proteases, pectinases e componentes da matriz extracelular de plantas (MONTEIRO, 2002). Culturas de interesse comercial podem ser afetadas por diversas doenças ocasionadas por fitopatógenos. Dentre esses patógenos destacam-se espécie de *xcc*, a exemplo da podridão negra (ALVAREZ, 2000, SEABRA JUNIOR *et al.*, 2013), doença disseminada principalmente através das sementes (TEBALDI *et al.*, 2007), que é comumente diagnosticada em regiões tropicais e subtropicais por possuírem clima úmido e quente (VICENTE; HOLUB, 2013). De acordo com Velasco *et al* (2013), a podridão negra é altamente agressiva em plantas do gênero das brássicas, causando manchas cloróticas, necrose dos tecidos foliares e afetando diretamente na queda da produtividade.

O controle da podridão negra pode ser realizado utilizando determinadas estratégias, a exemplo do controle biológico, químico e implementação de plantações resistentes (SEABRA-JÚNIOR *et al.*, 2008). O controle dessa doença, segundo Ryan *et al.*, (2011), se dá principalmente através da higienização dos instrumentos de plantio, disseminação de sementes viáveis e saudáveis, bem como, também a exclusão de plantas que apresentam qualquer manifestação da doença. Entretanto, nenhuma dessas práticas substitui o principal método de controle: os agrotóxicos fungicidas e bactericidas (LOPES E ALBUQUERQUE, 2018; VIERO *et al.*, 2016).

Nesse contexto, tem-se buscado alternativas, a exemplo de produtos naturais. O uso de produtos naturais, com diferentes finalidades (terapêutica, estética, farmacológica, agrícola), vem sendo empregado em escala mundial (FONSECA *et al.*, 2015). Estudos comprovaram que espécies de *Satureja hortensis* e *Calamintha nepeta*, (GORMEZ *et al.*, 2015), *Citrus aurantium*, *C. aurantifolia* e *Fortunella* sp, (MIRZAEI-NAJAFGHOLI *et al.*,

2017), *Origamum vulgare*, *Acorus calamus*, *Achillea millefolium* e *Carum cavi* (VASINAUSKIENĖ *et al.*, 2006) possuem atividade antimicrobiana sobre fitopatógenos.

De acordo com Lorenzi e Matos (2008) a *Varronia curassavica* Jacq, popularmente denominada erva baleeira, pertence à família *Boraginaceae* e sua extensão geográfica vai da América central ao sul do Brasil. A erva baleeira possui propriedades cicatrizantes, anti-inflamatórias e analgésicas, visto que o óleo essencial extraído das folhas apresentam em sua composição sesquiterpenos, halfa-humuleno e o transcariofileno (MEDEIROS *et al.*, 2007). O óleo essencial (OE) da *Varronia* possui atividade antimicrobiana contra *Colletotrichum truncatum* e *Oidium eucalypti* (SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014). Nesse sentido, pesquisas referentes à seleção de genótipos de *Varronia curassavica*, se ampliam para compreensão de aspectos agrônômicos e bioquímicos dessa planta (VAZ *et al.*, 2006).

Tendo em vista o potencial dos produtos fitoterápicos para fins antimicrobianos, a planta *Varronia curassavica* Jacq foi estudada a fim de determinar a atividade antimicrobiana in vitro (concentração mínima inibitória - MIC e concentração mínima bactericida – MBC), de sete genótipos de *Varronia curassavica* Jacq e de seus compostos majoritário  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno. Para o óleo essencial que apresentar menor MIC foi avaliado alterações na membrana citoplasmática de *Xanthomonas campestris*.

## OBJETIVOS

- Determinar a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e Concentração Mínima Bactericida (MBC) de sete genótipos de *Varronia curassavica* e seus principais compostos majoritários,  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno, sobre *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 629IBSBF
- Avaliar alterações na integridade de membrana citoplasmática *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 629IBSBF causadas pelos óleos essenciais de *Varronia curassavica* utilizando microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.

## METODOLOGIA

### 3.1 Condições de crescimento do microrganismo

Para os testes de atividade antimicrobiana e alterações na membrana citoplasmática do OE de *V. curassavica* foi utilizado o microrganismo *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 629IBSBF (Xcc-629IBSBF). O microrganismo foi adquirido da coleção de culturas de fitobactérias do Instituto Biológico (São Paulo, Brasil). A Xcc-629IBSBF foi cultivada a 35°C em meio de cultura YM (3 g.l<sup>-1</sup> extrato de levedura; 3g.l<sup>-1</sup> extrato de malte; 5 g.l<sup>-1</sup> peptona; sacarose 10 g.L<sup>-1</sup>, pH 6,0) sob agitação orbital (150 rpm/28°C ± 2). Para os testes de atividade antimicrobiana, o inóculo padronizado de Xcc-629IBSBF (1 x 10<sup>6</sup> UFC. ml<sup>-1</sup>) foi utilizado. Para isso, a densidade óptica (DO 600nm) foi medida em um espectrofotômetro a 600nm em aproximadamente 0,524 e 0,564 de modo a obter uma suspensão com 1 x 10<sup>6</sup> UFC. ml<sup>-1</sup>.

### 3.2 Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos das folhas frescas e jovens da parte aérea dos genótipos de *Varronia curassavica* (VCUR-002, VCUR-104, VCUR-202, VCUR-302, VCUR-303, VCUR-601, VCUR-701) coletadas do Banco Ativo de Germoplasma (BAG), localizadas no campus rural da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão. A identificação botânica dos sete genótipos foi realizada pela Dra. Ana Paula Prata da Universidade Federal de Alagoas. O voucher da espécie estudada foi depositado no Herbarium da Universidade Federal de Sergipe, Departamento de Biologia, no número (ASE 9404). A extração dos óleos essenciais dos sete genótipos de *V. curassavica* foi realizada por hidrodestilação em aparelho Clevenger e armazenados em frascos âmbar e mantidos a 4°C até análise. Os compostos componentes dos óleos essenciais dos sete genótipos foram obtidos por cromatografia gasosa (CG) acoplada ao espectrômetro de massa (EM) em aparelho SHIMADZU (QP2010 ultra, Kyoto, Japão). Os compostos majoritários  $\alpha$ -humuleno e  $\beta$ -cariofileno foram adquiridos da Merck (99% de pureza) e SigmaAldrich (98% de pureza), respectivamente.

### 3.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Varronia curassavica*

Em um projeto em andamento no Laboratório de Enzimologia o screening de óleos essenciais com atividade antimicrobiana sobre *Xanthomonas campestris* foi realizado. Os OEs de sete genótipos de *V. curassavica* apresentaram inibição da *Xcc* em concentração 100 µg mL<sup>-1</sup>. No presente projeto, a atividade antimicrobiana dos setes OEs de *V. curassavica* sobre o crescimento de Xcc-629IBSBF foram avaliadas através da concentração mínima inibitória (MIC) de acordo com o protocolo estabelecido pela NCCLS/CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (M7-A6). A MIC foi determinada pelo método de microdiluição em meio de cultura de *Xcc*. Para isso, os OEs de *V. curassavica* foram preparados em Dimetilsulfóxido (DMSO), (SigmaAldrich, 99,9% de pureza) a 100%. Para a análise de susceptibilidade, os OEs foram dissolvidos em DMSO (1%) na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup> e diluídos em concentrações variando de 1 a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, em caldo YM líquido. Os ensaios de microdiluição foram realizados em placas de 96 poços. Para isso, em cada poço foram adicionados 100 µl de cada solução diluída do OEs e 100 µl da suspensão bacteriana (Xcc-629IBSBF padronizado). As microplacas foram incubadas sob agitação orbital a (32°C/120 RPM) por 24hrs e lidas em leitor de microplacas Synergy™ H1 da BioTek Hybrid Technology utilizando um comprimento de onda de 600 nm. Como controle, foram incluídos poços de crescimento com 100 µl de Xcc-629IBSBF e 100 µl de meio YM líquidos e como controles estéreis foram utilizados 100 µl do meio líquido YM em 100 µl dos OEs e 100 µl dos OEs em 100 µl DMSO (1%). A CMI foi definida como a menor concentração de óleos que causar 100% de inibição do crescimento de Xcc-629IBSBF. A CMB foi determinada por subcultura de 20 µl de solução de poços contendo OEs e Xcc-629IBSBF. A MBC foi determinada como a menor concentração dos OEs nos poços de microplacas que deram redução do crescimento bacteriano nas placas de ágar em 100 % após 24hrs em comparação ao inóculo inicial de Xcc-629IBSBF. Todos os experimentos foram realizados em triplicata com 5 repetições.

### 3.4 Atividade antimicrobiana em diferentes tempos do OE do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF

A atividade antimicrobiana do óleo que apresentar menor MIC será determinado

pela técnica de micro diluição. Para avaliação da atividade antimicrobiana, alíquotas de

100 µl da cultura de Xcc padronizada foram distribuídas em poços de placas de micro diluição. Cada poço recebeu 100 µl do óleo essencial (2x MIC, 1x MIC, 1/2x MIC) na presença do meio de cultura YM líquido. Nos pontos de tempo escolhidos (5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180 e 240 min) as microplacas foram lidas em

leitor de microplacas Synergy™ H1 da BioTek Hybrid Technology utilizando um comprimento de onda de 600 nm. Como controle, foram incluídos poços de crescimento

com 100 µl de Xcc-629IBSBF e 100 µl de meio YM líquidos e como controle estéril foi utilizado 100 µl do meio líquido YM em 100 µl dos OEs e 100 µl dos OEs em 100 µl DMSO (1%).

### **3.5 Ensaio de viabilidade celular do OE do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF por Microscopia de Fluorescência**

A viabilidade bacteriana e integridade da membrana citoplasmática foram avaliadas utilizando o kit de ensaio de viabilidade bacteriana LIVE /DEAD BacLight para microscopia [L7007], de Invitrogen, utilizando uma mistura dos fluoro compostos: SYTO 9 (para células vivas) e IP (para células mortas) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. Para isso, foram adicionados 3µL da mistura às células de Xcc-629IBSBF (106 CFU. mL<sup>-1</sup>) previamente tratadas com diferentes concentrações do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF (2x, 1x, 1/2x, 1/4x e 1/8x MIC) na presença do meio de cultura YM líquido durante 5 min. As células de Xcc-629IBSBF não tratadas e tratadas em banho maria (100 0C/10 min) foram mantidas como controle. As amostras foram incubadas durante 15 minutos no escuro à temperatura ambiente e 5 µL desta amostra foram alíquotadas entre a lamínula e a lâmina de vidro. As imagens foram capturadas usando um microscópio de fluorescência ZeissAxio imagens M2



(ZEISS Microscopy M2, EUA), equipado com uma objetiva EC Plan-Neofluar de 40X, usando a configuração de fluorescência para células FITC (células verdes /SYTO-9 + ve) e IP (células vermelhas / IP + ve).

### **3.6 Efeito do óleo do OE do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF na integridade da membrana bacteriana**

#### ***Avaliação por espectrofluorimetria***

As células bacterianas, na fase exponencial ( $106 \text{ CFU.ml}^{-1}$ ) de Xcc-629IBSBF, cultivadas em meio YM foram tratadas por (5, 15, 30, 45, 60, 120 e 180min) com várias concentrações do OE do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF (2x MIC, 1x MIC, 1/2x MIC, 1/4x MIC e 1/8x MIC) na presença do meio de cultura YM líquido. Após a exposição ao óleo essencial de LGRA-106, as células foram centrifugadas ( $14000 \text{ g}/50^\circ\text{C}/5 \text{ min}$ ), lavadas em tampão e incubadas com IP (3 mM) a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 min no escuro. Em seguida, foram adicionados  $200 \mu\text{l}$  da suspensão de células marcadas em poços em placas de microdiluição de 96 poços. A intensidade de fluorescência do IP foi medida através do leitor de microplacas Synergy™ H1 (BioTek Hybrid Technology) usando um filtro de excitação 544/20 nm e 620 nm/40 nm de emissão (comprimento de onda de excitação e emissão para IP). Como controle, foram incluídos poços de crescimento com Xcc- 629IBSBF não tratadas ( $106 \text{ CFU. ml}^{-1}$ ), marcadas com IP e Xcc-629IBSBF ( $106 \text{ CFU.ml}^{-1}$ ) tratadas em banho-maria, por 5 min a  $100^\circ\text{C}$ , marcadas com IP. Cada experimento foi repetido independentemente em três dias separados.

#### ***Avaliação por citometria de fluxo***

A avaliação da integridade de membrana plasmática de Xcc-629IBSB foi analisada utilizando um citometro de fluxo (Attune® Acoustic Focusing, Life technologies) equipado com um 15 MW Argon íon laser a 488 nm. Um filtro de passagem de banda de 530 nm (515 a 545 nm) foi usado para coletar a fluorescência verde (FL1) e um filtro de passagem

de banda de 585 nm (564 a 606 nm) para coletar a fluorescência vermelha (FL3). Para a avaliação foi usado uma mistura dos fluorocompostos: cFDA (para células de Xcc-629IBSBF viáveis) e IP (para células de Xcc-629IBSBF com membrana celular danificada). Para isso, foram adicionados 20  $\mu$ l de iodeto de propídio (IP) (3000  $\mu$ M; Invitrogen) e 50  $\mu$ l de cFDA (Molecular Probes, Leiden, Netherlands), às células de Xcc-629IBSBF previamente tratadas com diferentes concentrações do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF (2x MIC, 1x MIC, 1/2x MIC, 1/4x MIC) durante 5 min. Após marcação, as células foram incubadas durante 15 min, no escuro à 35°C. Após o período, as células foram lavadas três vezes com TRIS-HCl (pH=8,3) para remover o corante não ligado. Após lavagem, as células foram ressuspensas em 500  $\mu$ l de tampão TRIS-HCl (pH=8,3) e analisadas no citômetro de fluxo. Como controle, foram incluídas células de Xcc-629IBSBF não tratadas ( $10^6$  CFU.mL<sup>-1</sup>) e marcadas com: IP, cFDA, IP + cFDA e banho-maria (por 5min a 100°C, sendo posteriormente marcadas com IP e cFDA). Um total de 10.000 eventos foram adquiridos e analisados pelo programa Attune Cytometer Software.

## RESULTADOS

### 4.1 Obtenção dos óleos essenciais

Os materiais vegetais utilizados para a extração de óleo essencial foram colhidos do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe (Tabela 1).

**Tabela 1.** Informações geográficas dos 7 acessos de *V. curassavica* Jacq, do Banco Ativo de Germoplasma de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal de Sergipe.

| Código do Acesso | Origem (Município, Estado, País) | Nº Voucher (Herbário UFS) | Dados georreferenciais     |
|------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------------------|
| VCUR-002         | Ubatuba, São Paulo, Brasil       | 36095                     | 23°32'18.0"S; 45°03'73.4"W |
| VCUR-104         | Graccho Cardoso, Sergipe, Brasil | 36100                     | 10°14'46.1"S; 37°12'52.8"W |
| VCUR-202         | Tobias Barreto, Sergipe, Brasil  | 33471                     | 11°04'10.1"S; 38°04'03.4"W |
| VCUR-302         | São Cristóvão, Sergipe, Brasil   | 14735                     | 10°54'59.7"S; 37°11'16.3"W |
| VCUR-303         | São Cristóvão, Sergipe, Brasil   | 36205                     | 10°54'48.5"S; 37°11'50.3"W |

|          |                                    |       |                            |
|----------|------------------------------------|-------|----------------------------|
| VCUR-601 | Itabi, Sergipe, Brasil             | 30914 | 10°09'24.9"S; 37°08'27.0"W |
| VCUR-701 | Cedro de São João, Sergipe, Brasil | 36110 | 10°18'06.9"S; 36°53'27.7"W |

#### 4.2. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Varronia curassavica*

Dos sete óleos testados, todos foram capazes de inibir o crescimento do fitopatógenos-alvo Xcc-629IBSBF (Tabela 2). Os genótipos 002 e 104 apresentaram maiores valores, sendo que a CMI foi de 1,0mg.ml<sup>-1</sup> em comparação aos demais (202, 302, 303, 601 e 701). Os genótipos 202 e 302 apresentaram os menores valores de CMI (0,25 mg.ml<sup>-1</sup> e 0,29 mg.ml<sup>-1</sup>), respectivamente.

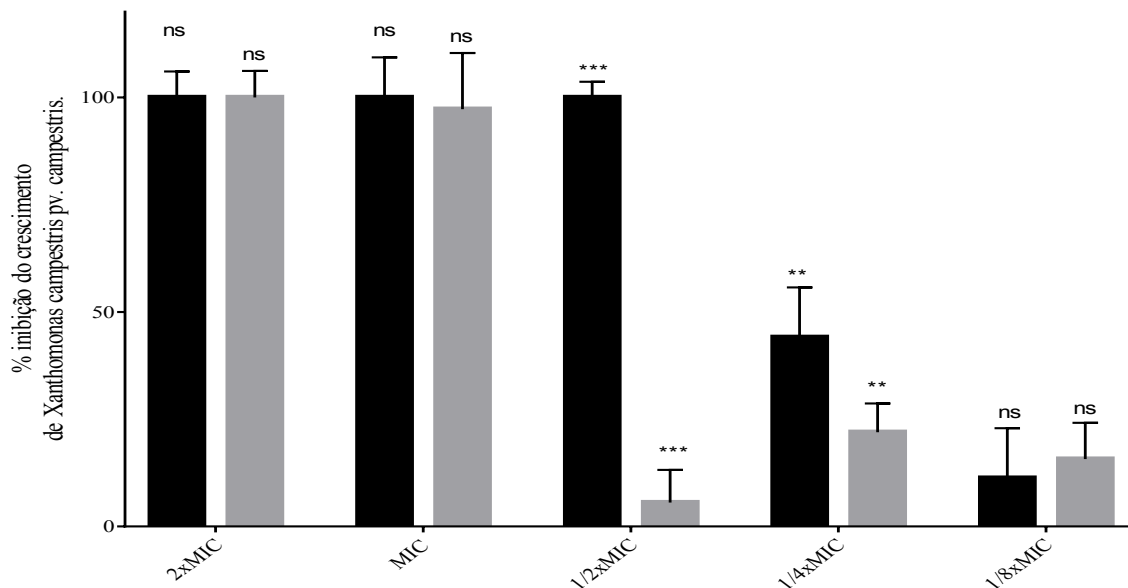
**Tabela 2.** Concentrações mínimas inibitórias CMI para a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais da folha dos diferentes genótipos de *Varronia curassavica*.

| <i>Varronia curassavica</i> | CMI <sub>100</sub> -SD-OE<br>(mg/mL) | MBC <sub>100</sub><br>(mg/mL) |
|-----------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| VCUR-002                    | <1,0 ± 0,00645                       | <1,0                          |
| VCUR-104                    | <1,0 ± 0,00488                       | <1,0                          |
| VCUR-202                    | 0,5 ± 0,00256                        | 0,5                           |
| VCUR-302                    | 0,5 ± 0,00299                        | 0,5                           |
| VCUR-303                    | <1,0 ± 0,0078                        | <1,0                          |
| VCUR-601                    | <1,0 ± 0,0112                        | <1,0                          |
| VCUR-701                    | <1,0 ± 0,0176                        | <1,0                          |

CMI<sub>100</sub> refere-se à concentração mínima necessária para inibir 100 % do crescimento da fitobactéria Xcc.

#### 4.2 Atividade antimicrobiana em diferentes tempos do OE do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF

Os OEs de VCUR-202 e 302 inibiram 100% do crescimento celular de Xcc-629IBSBF, após 24 horas de exposição nas concentrações de (2x, 1x, 1/2x MIC) para VCUR-202 e (2x, 1x MIC) para VCUR-302 (Figura 1).



**Figura 1.** Atividade antimicrobiana após 24 h de exposição aos OEs de VCUR-202 (■) e VCUR-302 (■) sobre *Xcc. campestris*. Teste realizado em meio líquido. Todos os dados representam médias  $\pm$  erro padrão da média (EPM) de 3 experimentos independentes (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

As concentrações de 1/4 e 1/8 do MIC para (VCUR-202), reduziram em apenas 38,26%  $\pm$  1,59 e 18,80%  $\pm$  7,62 o crescimento do fitopatógeno-alvo. Já para o genótipo VCUR-302, as concentrações de 1/2, 1/4 e 1/8 do MIC reduziram apenas 5,60  $\pm$  7,61, 21,96  $\pm$  6,71 e 15,70  $\pm$  8,46% do crescimento celular de *Xcc*. Estes dados podem ser confirmados pelas Unidades Formadoras de Colônias (UFC.mL<sup>-1</sup>) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Concentrações mínimas inibitórias CMI e Concentração mínima bactericida CMB para a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de VCUR-202 e 302.

| Genótipos de<br><i>V. curassavica</i> | VCUR-202                       |                                | VCUR-302                       |                                |
|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
|                                       | CMI<br>( mg.mL <sup>-1</sup> ) | UFC<br>( mg.mL <sup>-1</sup> ) | CMI<br>( mg.mL <sup>-1</sup> ) | UFC<br>( mg.mL <sup>-1</sup> ) |
| 2 x CMI                               | 1,0                            | 0                              | 1,0                            | 0                              |
| 1 x CMI                               | 0,5                            | 0                              | 0,5                            | 0                              |
| 1/2 x CMI                             | 0,25                           | 13                             | 0,25                           | 10 <sup>3</sup>                |
| 1/4 x CMI                             | 0,125                          | 10 <sup>3</sup>                | 0,125                          | 10 <sup>4</sup>                |
| 1/8 x CMI                             | 0,065                          | 10 <sup>3</sup>                | 0,065                          | 10 <sup>5</sup>                |

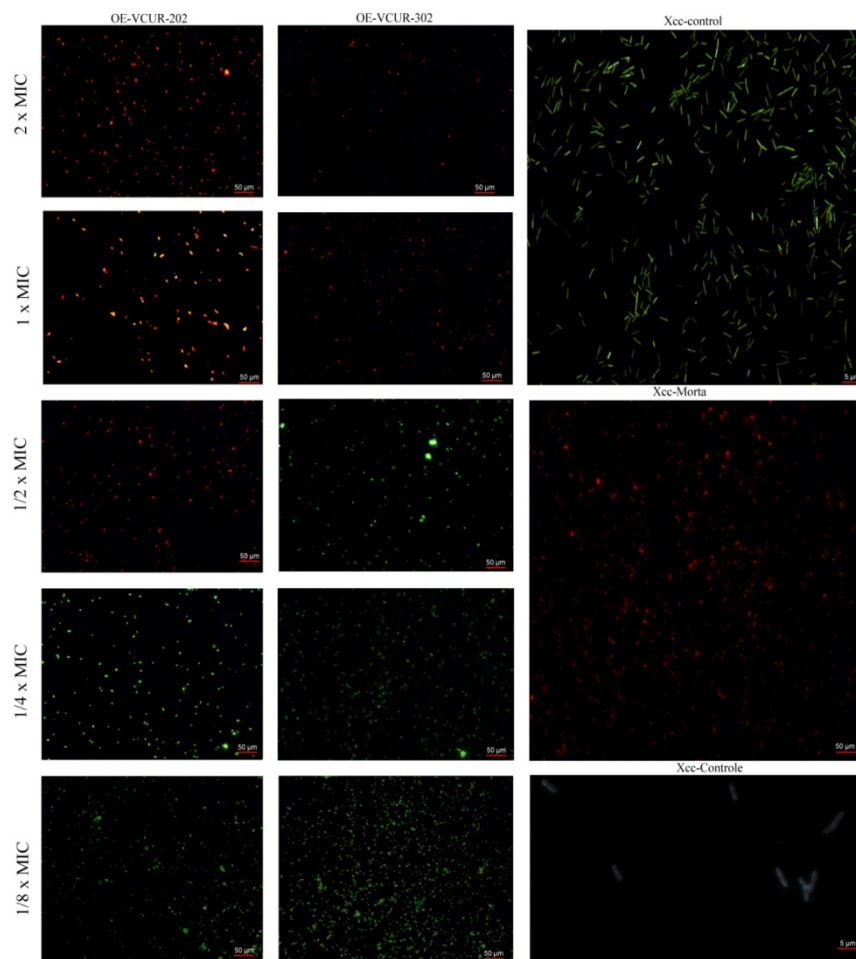
De acordo com a análise de crescimento entre os tempos de 0min, 1, 3, 6, 12 e 24 horas (Figura 2a e b) e dados da comparação de média das diferentes taxas de crescimento celular (%) de *Xcc* (Tabela 4), não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na % do crescimento de *Xcc*, quando utilizadas às concentrações de 2x e 1x MIC, para OE-VCUR-202 ao longo de 24 horas de experimento. Entretanto, para as concentrações de 1/4x e 1/8x MIC, observou-se uma diminuição gradual, na % de *Xcc*, à medida que aumentava o tempo de incubação de 24hrs ( $p < 0,05$ ) (Tabela 4). No final de 6 horas, a % de *Xcc* foi estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) para todas as concentrações testadas.

**Tabela 4.** Efeito da atividade antimicrobiana dos OEs de VCUR-202 e 302 na taxa de crescimento celular (%) de *Xcc* ao longo de 24 horas de incubação.

| Tempo (h) | Concentração ( mg/mL <sup>-1</sup> ) OEs-SD |                              |                             |                             |                             |
|-----------|---|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| VCUR-202  | 2xMIC                                       | 1x MIC                       | 1/2 x MIC                   | 1/4 x MIC                   | 1/8 x MIC                   |
| 0         | 88,27 ± 5,20 <sup>Aa</sup>                  | 88,98 ± 5,69 <sup>Aa</sup>   | 98,00 ± 10,75 <sup>Aa</sup> | 89,41 ± 10,47 <sup>Aa</sup> | 48,97 ± 40,10 <sup>Ab</sup> |
| 1         | 78,40±6,12 <sup>Aa</sup>                    | 83,62 ± 5,38 <sup>Aa</sup>   | 82,70 ±7,60 <sup>Ba</sup>   | 70,83 ± 20,93 <sup>Ba</sup> | 30,39± 22,63 <sup>Bb</sup>  |
| 3         | 95,76 ± 2,86 <sup>Aa</sup>                  | 77,00 ± 6,02 <sup>Ab</sup>   | 61,42 ± 4,04 <sup>Cc</sup>  | 32,98 ± 14,05 <sup>Cd</sup> | 11,06± 9,07 <sup>Cc</sup>   |
| 6         | 85,39 ±2,40 <sup>Aa</sup>                   | 80,30 ± 1,77 <sup>Aa</sup>   | 54,91 ± 3,45 <sup>Cb</sup>  | 33,25 ± 6,60 <sup>Cc</sup>  | 15,36 ± 12,13 <sup>Cd</sup> |
| 12        | 100,00 ± 4,25 <sup>Aa</sup>                 | 84,34 ± 3,76 <sup>Ab</sup>   | 31,67 ± 7,63 <sup>Dc</sup>  | 40,46 ± 11,29 <sup>Cc</sup> | 36,09± 17,32 <sup>Bc</sup>  |
| 24        | 100,00 ± 6,09 <sup>Aa</sup>                 | 100,00 ± 9,38 <sup>Aa</sup>  | 100,00 ± 3,68 <sup>Aa</sup> | 38,26± 1,59 <sup>Cb</sup>   | 18,80± 7,62 <sup>Cc</sup>   |
| VCUR-302  | 2xMIC                                       | 1x MIC                       | 1/2 x MIC                   | 1/4 x MIC                   | 1/8 x MIC                   |
| 0         | 80,83 ± 4,48 <sup>Aa</sup>                  | 92,99±3,73 <sup>Aa</sup>     | 83,12 ± 5,39 <sup>Aa</sup>  | 84,26 ± 5,98 <sup>Aa</sup>  | 77,68 ± 5,14 <sup>Aa</sup>  |
| 1         | 59,57 ± 3,53 <sup>Ba</sup>                  | 82,19± 11,75 <sup>Bb</sup>   | 86,18 ± 6,22 <sup>Ab</sup>  | 79,63 ± 17,23 <sup>Ab</sup> | 66,43 ± 22,03 <sup>Aa</sup> |
| 3         | 55,87 ± 8,97 <sup>Ba</sup>                  | 71,79±22,75 <sup>Bb</sup>    | 82,68 ± 13,72 <sup>Ab</sup> | 56,66 ± 19,12 <sup>Ba</sup> | 39,79 ± 19,68 <sup>Bc</sup> |
| 6         | 52,14± 12,02 <sup>Ba</sup>                  | 87,81 ± 11,38 <sup>Ab</sup>  | 65,54 ± 16,17 <sup>Bc</sup> | 48,56 ± 13,99 <sup>Ba</sup> | 32,9 ± 9,61 <sup>Bd</sup>   |
| 12        | 61,91 ± 4,99 <sup>Ba</sup>                  | 88,27±6,08 <sup>Ab</sup>     | 47,4 ± 10,54 <sup>Cc</sup>  | 46,6 ± 9,42 <sup>Bc</sup>   | 29,29 ± 5,78 <sup>Bd</sup>  |
| 24        | 100,00 ± 6,61 <sup>Ca</sup>                 | 100,00 ± 13,13 <sup>Aa</sup> | 31,94 ± 5,59 <sup>Db</sup>  | 21,96 ± 6,7 <sup>Cb</sup>   | 15,69 ± 8,46 <sup>Cb</sup>  |

#### 4.3 Ensaio de viabilidade celular do OE do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra *Xcc*-629IBSBF por Microscopia de Fluorescência.

Os resultados obtidos na análise da viabilidade celular ilustram que nas concentrações 2xMIC e 1xMIC, os dois genótipos (VCUR-202 e -302) inibiram o crescimento celular em 100%. Na concentração 1/2MIC, houve inibição somente pelo genótipo 202; Nas concentrações 1/4MIC e 1/8 MIC não houve inibição por nenhum dos genótipos, mostrando resultados já esperados, por conta das baixas concentrações.



**Figura 2. Ensaio de microscopia de fluorescência para viabilidade de Xcc-629IBSBF contra óleo essencial de *VRA*.** As bactérias foram expostas a 2MIC (1000  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ), MIC (500  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ), 1/2 MIC (250  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ), 1/4MIC (125  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) e 1/8MIC (65,5  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ ) do óleo essencial de VCUR-202 e 302 durante 6 horas a 35°C.

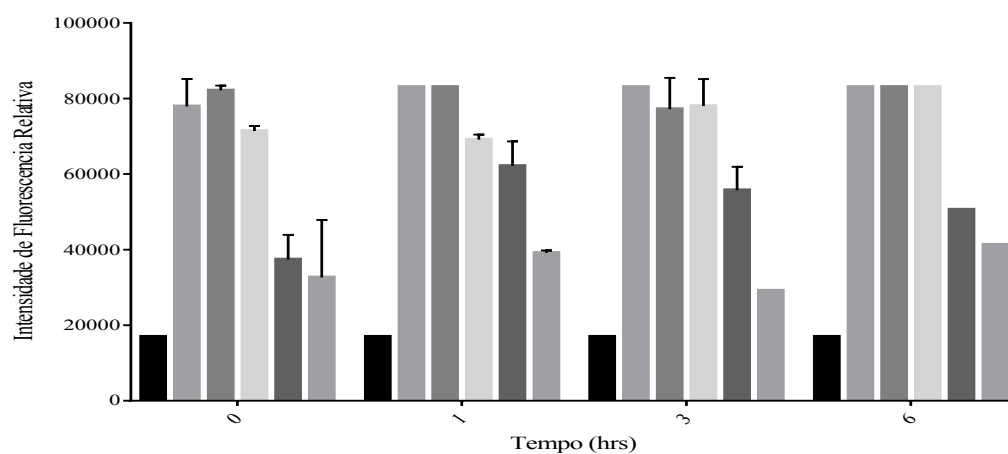
#### **4.4 Efeito do óleo do OE do genótipo de *V. curassavica* com maior atividade antimicrobiana contra Xcc-629IBSBF na integridade da membrana bacteriana.**

##### ***Avaliação por espectrofluorimetria.***

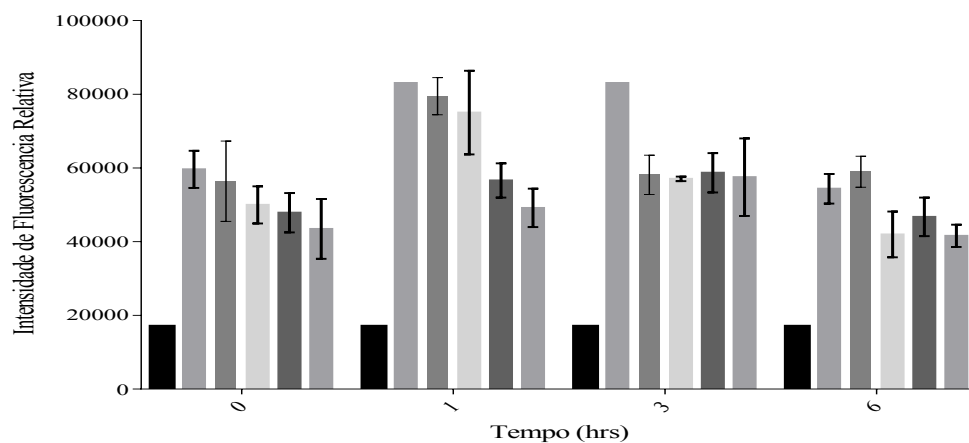
Para avaliar o mecanismo antimicrobiano do OE-VCUR-202 e 302, com foco na sua habilidade de permeabilizar a membrana citoplasmática foi utilizado o iodeto de propídio. A absorção de IP nas células de Xcc-629IBSBF tratadas com o genótipo de VCUR-202, 302 e controle estão representadas na Fig. 2a,b. Foi observado o aumento da intensidade de

fluorescência IP quando as células de Xcc-629IBSBF (Fig.2a,b.) foram expostas a diferentes concentrações de (2x MIC, 1x MIC, 1/2x MIC) nas 6 primeiras horas para OE-VUCR-202 e 2x MIC, 1x MIC para OE-VUCR-302, em 3 horas, em relação ao controle, sem exposição ao óleo (Fig.2a e b.). No entanto, após 6 horas de exposição à OE-VUCR-202, a intensidade IP diminuiu (1/4 e 1/8x MIC) (Fig.2a)e 2 x MIC (Fig.2b). Isso pode ser devido à lise completa e vazamento do conteúdo celular de células de Xcc-629IBSBF.







A



B



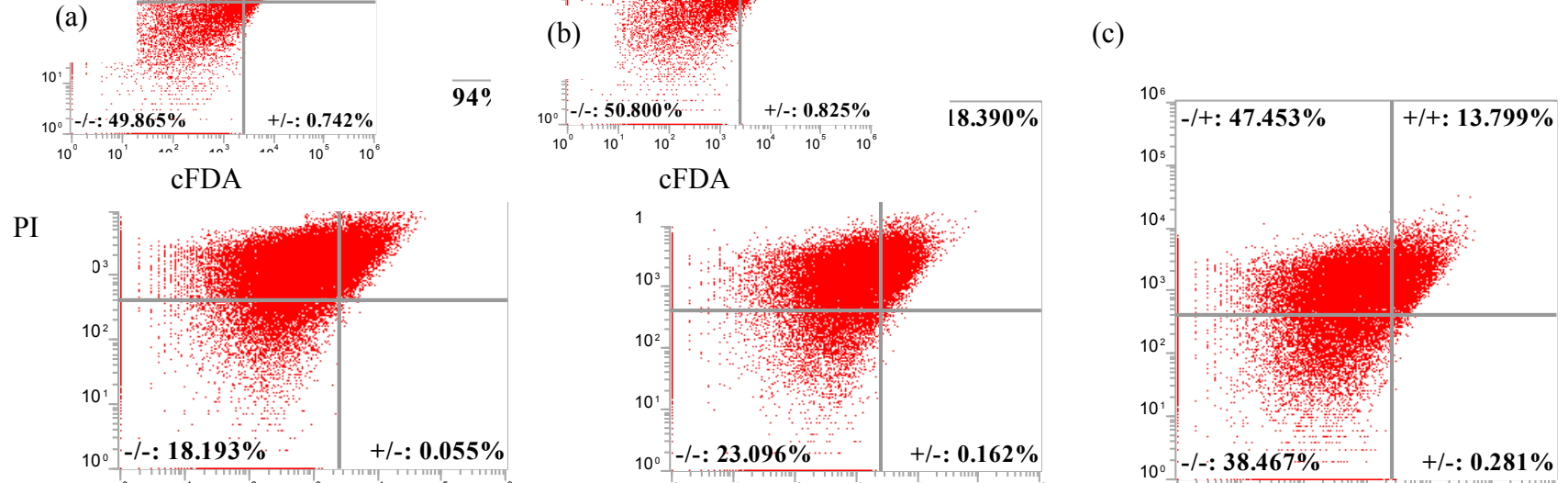
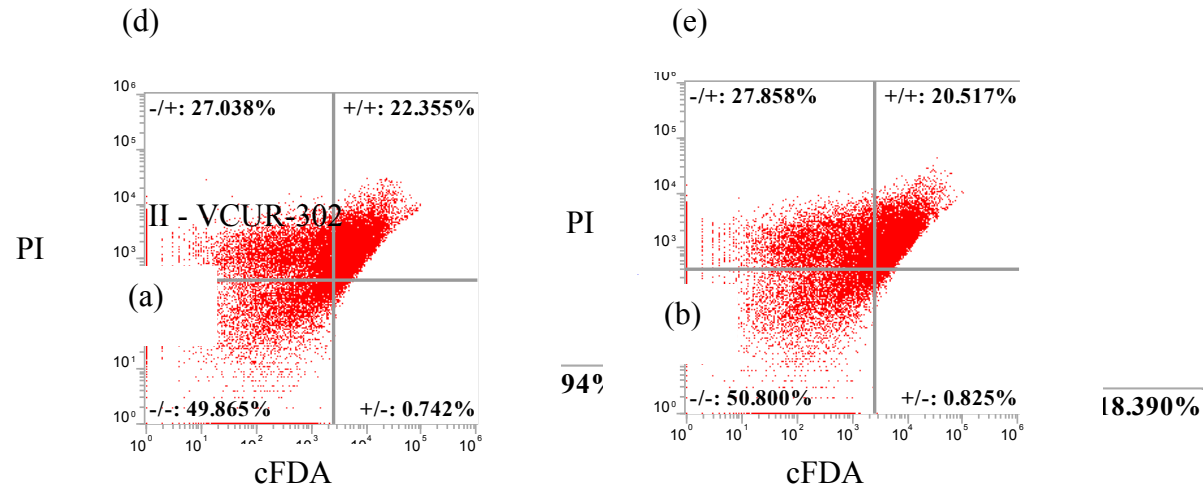
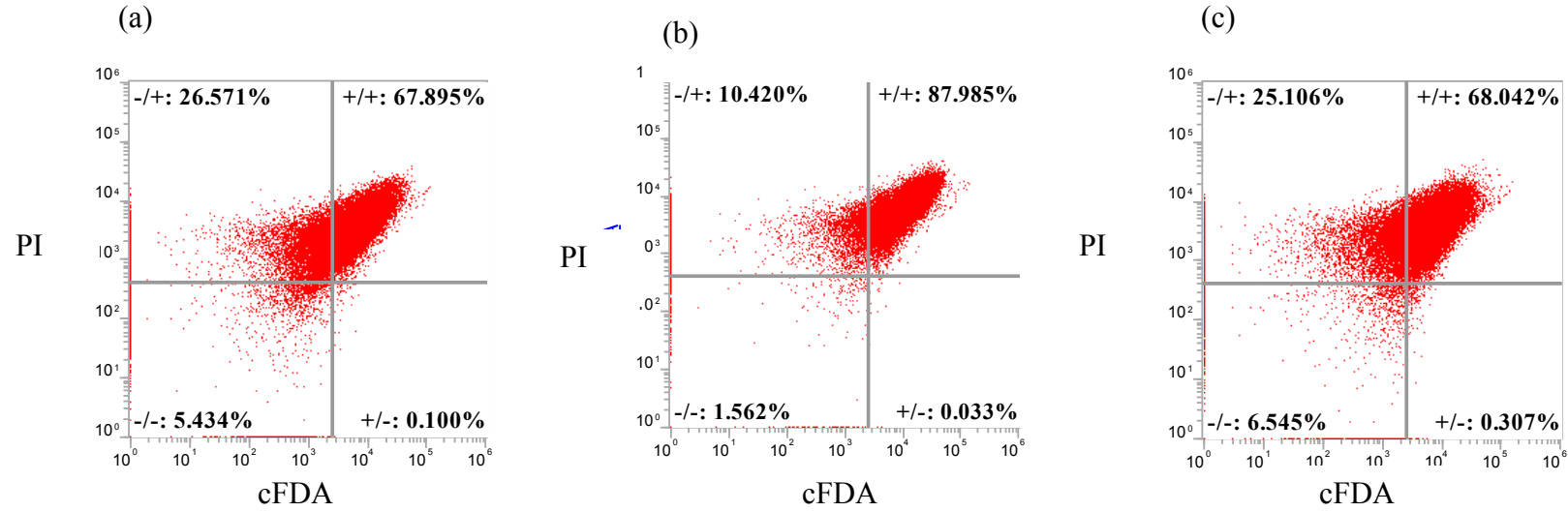


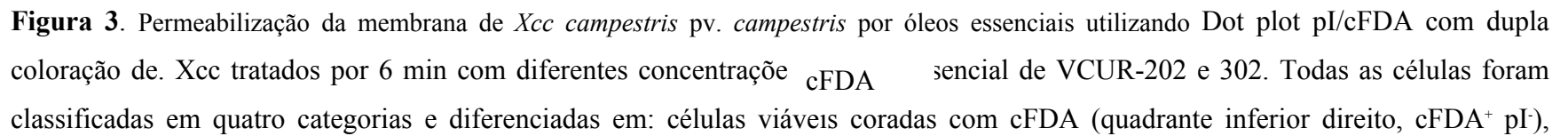
**Figura 2.** Permeabilização da membrana de *Xcc campestris* pv. *campestris* por óleos essenciais utilizando iodeto de propídio (IP) através da técnica espectrofluorimétrica. Intensidade de fluorescência (excitação 488nm / emissão 620nm) de IP em células de *Xcc. campestris* expostas ao óleo essencial de VCUR 202 (A) e 302 (B) (2 x MIC  ; 1 x MIC  ; 1/2 x MIC  ; 1/4 x MIC  ; 1/8 x MIC  ) por até 6 horas (Fig 2A e B) ou não tratados (*Xcc*-nt;  ). Os resultados são expressos como média e desvio padrão de três experimentos independentes.

### ***Avaliação por citometria de fluxo***

Na avaliação por citometria de fluxo foi possível observar que células de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* tratadas com o OE de *Varronia curassavica* apresentaram redução da população de células viáveis, como ilustrado na Figura 3. O resultado nos mostra que a concentração de 1xMIC para o genótipo de VAR-202 matou aproximadamente 88% das células de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* expostas ao OE VAR-202 após 6 horas de tratamento. Em relação ao OE de VAR-302, foi constatado que a concentração mais eficaz foi a de 2xMIC, matando cerca de 67% das células de *Xcc*.

## I - VCUR-202





células lesionadas duplamente coradas com pI e cFDA (quadrante superior direito, cFDA<sup>+</sup> pI<sup>+</sup>), células mortas coradas com pI (quadrante superior esquerdo, cFDA<sup>-</sup>pI<sup>+</sup>) e células não coradas (quadrante inferior esquerdo, cFDA<sup>-</sup>PI<sup>-</sup>). (A – E).

## DISCUSSÃO

Estes resultados confirmam a ação antimicrobiana do óleo essencial que podem ser explicados pela presença de alguns compostos majoritários, dentre outros que fazem parte da composição química da planta *Varronia curassavica*. Corroborando os resultados, Ramos *et al.*, (2012) ao analisar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de tomilho e orégano verificou-se considerável atividade antibacteriana frente à *Xanthomonas albilineans*. Comprovaram também o efeito bactericida do óleo essencial de orégano frente à *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, ressaltando que o responsável por tal atividade é o carvacrol, um dos compostos majoritários encontrados através da análise cromatográfica (Souza *et al.*, 2008). Resultado semelhante de atividade antimicrobiana demonstrada pelo óleo essencial extraído de *Cordia curassavica* podem ser atribuídos à presença de alguns componentes, como flavonas, terpenos, que já são conhecidos por exibir atividade antimicrobiana (Hernandez *et al.*, 2007).

As concentrações de MIC utilizadas neste trabalho podem ser também encontradas em outros estudos. De acordo com Silva (2017), pode-se encontrar na literatura produtos naturais com concentrações mínimas inibitórias (MICs) na faixa de 500 e 1000 µg/mL avaliados em *Xanthomonas citri*. Entretanto, o efeito antimicrobiano de um óleo pode variar a depender da sua concentração, pois de acordo com Nazzaro *et al.*, (2013), um componente antimicrobiano do OE em altas concentrações pode vir a desnaturar proteínas.

## CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que os genótipos de VAR-202 e 302, nas concentrações de 1x MIC e 2x MIC, respectivamente, são eficazes contra o Fitopatógeno *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, enquanto que as concentrações de 1/2, 1/4 e 1/8 não apresentaram a mesma eficácia.

## PERSPECTIVAS

Com os resultados obtidos através deste trabalho, testes *in vivo* poderão ser realizados futuramente a fim de comprovar a aplicabilidade do óleo essencial de *Varronia curassavica*, como controle da podridão-negra, em lavouras de couve.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, A. M. Black rot of crucifers. In: SLUSARENKO, A.; FRASSER R. S. S.; VAN LOON, L. C (Ed.). Mechanisms of resistance of plant diseases. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, cap.1, p. 21-52, 2000.

DE CASTRO, N. D.A. et al. Essential oils of *Varronia curassavica* accessions have different activity against white spot disease in freshwater fish. Parasitol. Res. 117, 97–105. 2018.

JACQUES, M.-A., ARLAT, M.; BOULANGER, A.; BOUREAU, T.; CARRÈRE, S.; CESBRON, S.; *et al.* Using ecology, physiology, and genomics to understand host specificity in *Xanthomonas*. Annu. Rev. Phytopathol. 54, 163–187. 2016.

GORMEZ, A.; BOZARI, S.; YANMIS, D.; GULLUCE, M.; SAHIN, F.; AGAR, G. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils of Two Species of *Lamiaceae* against Phytopathogenic Bacteria. Polish journal of microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists, v. 64, n. 2, p. 121–7, 2015.

HE, Y. W.; WU, J.; ZHOU, L.; YANG, F.; HE, Y. Q.; JIANG, B. L.; BAI, L.; XU, Y.; DENG, Z.; TANG, J. L.; ZHANG, L. H. *Xanthomonas campestris* diffusible factor is 3-hydroxybenzoic acid and is associated with xanthomonadin biosynthesis, cell viability,

antioxidant activity, and systemic invasion. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, Saint Paul, 2011.

HERNANDEZ, T.; CANALES, M.; TERAN, B.; AVILA, O.; DURAN, A.; GARCIA, A. M.; HERNANDEZ, H.; ANGELES-LOPEZ, O.; FERNANDEZ-ARAIZA, M.; AVILA, G. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2007.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. DE O.; BARBOSA FILHO, J. M.; MARQUES, M. O. M. Interference of heating on the antimicrobial activity and chemical composition of *Origanum vulgare* L. ( Lamiaceae ) essential oil. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 2008.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde Debate* | Rio De Janeiro, V. 42, N. 117, P. 518-534, abr-jun 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas medicinais no Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. *British Journal of Pharmacology*, v.151, 2007.

MIRZAEI-NAJAFGHOLI, H.; TARIGHI, S.; GOLMOHAMMADI, M.; TAHERI, P. The Effect of Citrus Essential Oils and Their Constituents on Growth of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. *Molecules*, v. 22, n. 4, p. 591, 14 abr. 2017.

MONTEIRO, L. Produção de Substâncias biotivas de *Bacillus* spp. Contra *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. 2002.

NAZZARO, F., FRATIANNI, F., DE MARTINO, L., COPPOLA, R., DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals (Basel)* 6, 1451–1474. 2013.

RAMOS, E. T. de A. BORGES, C. A. de S. TEBALDI V. M. R. Atividade bactericida dos extratos hidroalcoólicos de hera-roxa e capim-limão e dos óleos essenciais de orégano, tomilho e melaleuca sobre *Xanthomonas albilineans*. *Cadernos UniFOA*, v.7, n. 19, 2012.

ROTTAVA, I. Seleção de linhagens de *Xanthomonas* sp. para produção de goma xantana. Departamento de ciências agrárias, Erechim-RS, 2005.

RYAN, R. P. *et al.* Pathogenomics of *Xanthomonas*: understanding bacterium–plant interactions. *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, n. 5, p. 344–355, 11 maio 2011.

SEABRA JÚNIOR, S. *et al.* Reação de híbridos de brócolis' tipo cabeça única à podridão negra. *Summa Phytopathologica*, Botucatu, 2008.

SEABRA JUNIOR, S. *et al.* Suscetibilidade à podridão negra e produtividade de brócolis em função de doses de nitrogênio e potássio. *Hortic. Bras.*, Vitória da Conquista, v. 31, n. 3, p. 426-431, Sept. 2013.

SILVA, A.C.; SOUZA, P.E.; MACHADO, J.C.; SILVA JR., B.M.; PINTO, J.E.B.P. Effectiveness of essential oils in the treatment of *Colletotrichum truncatum*-infected soybean seeds. *Tropical Plant Pathology*, v. 37, n. 5, p. 305-313, 2012.

SILVA, A.C.; SOUZA, P.E.; RESENDE, M.L.V.; SILVA JR., M.B.; RIBEIRO JR., P.M.; ZEVIANI, W.M. Local and systemic control of powdery mildew in eucalyptus using essential oils and decoctions from traditional Brazilian medicinal plants. *Forest Pathology*, v. 44, p. 145–153, 2014.



SILVA, D. F. da, *et al.* Eficácia dos flavonóides hesperidina e naringenina e o fenol ácido isovanílico complexados com Mg (II), para o controle da bactéria *xanthomonas citri* ssp. *citri*. 2017.

VASINAUSKIENĖ, M.; RADUŠIENĖ, J.; ZITIKAITĖ, I.; SURVILIENĖ, E. Antibacterial activities of essential oils from aromatic and medicinal plants against growth of phytopathogenic bacteria. *Control*, v. 4, p. 437–440, 2006.

VAZ, A.P.A. *et al.* Biomassa e composição química de genótipos melhorados de espécies medicinais cultivadas em quatro municípios paulistas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, 2006.

VELASCO, P.; LEMA, M.; FRANCISCO, M.; SOENGAS, P.; ELENA CARTEA, M. In Vivo and in vitro effects of secondary metabolites against *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecules*, v. 18, n. 9, p. 11131–11143, 2013.

VICENTE, J. G.; HOLUB, E. B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (cause of black rot of crucifers) in the genomic era is still a worldwide threat to brassica crops. *Molecular plant pathology*, v. 14, n. 1. 2013.

VIEIRO, C. M. *et al.* Sociedade de risco: o uso dos agrotóxicos e implicações na saúde do trabalhador rural. *Esc Anna Nery*, v. 20, n. 1, 2016, p. 99-105.

VIGO-SCHULTZ, Sandra Cristina et al. Avaliação da eficácia da tintura etanólica de guaco (*Mikania glomerata*) no controle da podridão negra (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) em couve-flor. *Semina: ciências agrárias*, v. 27, n. 4, 2006.

## OUTRAS ATIVIDADES

A aluna contribuiu para a realização de experimentos sobre atividade antimicrobiana com óleos essenciais de *Lippia gracilis* sobre o patógeno de plantas *Xanthomonas*

*campestris*pv. *campestris*, o que resultou na confecção do artigo que foi publicado na revista PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY cujo título é “Antimicrobial activity of Lippia gracilis essential oils on the plant pathogen Xanthomonas campestris pv. campestris and their effect on membrane integrity”. Participou também da confecção do artigo “Production of xylanases by Bacillus sp . TC-DT13 in solid state fermentation using bran wheat”, o qual foi publicado na revista PREPARATIVE BIOCHEMISTRY & BIOTECHNOLOGY. Além disso, apresentou o trabalho intitulado de “ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OILS OF VARRONIA CURASSAVICA AGAINST XANTHOMONAS CAMPESTRIS PV AND EFFECT ON THE INTEGRITY OF THE CYTOPLASMIC MEMBRANE” em formato de pôster durante o 30º Congresso Brasileiro de Microbiologia, realizado em Maceió – AL.